KAKEN
6554036

# 不均一系微小粒子の
# 生物活性測定システムの開発

(研究課題番号　06554036)

平成８年度文部省科学研究費基盤研究Ｂ(1)
研究成果報告書



平成９年３月

研究代表者　吉　岡　崇　仁
(名古屋大学大気水圏科学研究所)

## はしがき

現在、生態学・環境科学が直面する課題として、人間活動による地球環境の改変に伴う生態物質循環系の変動や、遺伝子工学的に創造された微生物（GEM）の野外放出の影響解明があげられる。水界・土壌生態系は、様々な微小粒子からなる不均一な系として動いており、そこでの個体群動態や物質循環系の変化を予測するには、この不均一性を解きほぐせるか否かが重要なポイントとなる。地球温暖化問題においても、温室効果ガスであるメタンや亜酸化窒素の生成・消滅は、土壌や水中の酸化還元状態に支配されるところが大きく、微小環境とこれら温室効果ガスの動態に関わる微生物との関連は解明が急がれるところである。

申請者らが長年携わってきた、水界生態系における物質循環に関する一連の研究においても、プランクトン等の微小生物を種類あるいは個体毎に測定対象とすることの重要性・有効性が強く認識された。このことは、微小部位の識別が重要という点で、微小環境の不均一さと生物活動の関係を研究することと通じるものがある。様々な動植物プランクトン等を分取し、取り込み活性を測定したり、生化学組成や炭素・窒素同位体比を測定して、湖沼中での生物活動を少しでも詳細に把握することが試みられている。しかしながら、プランクトンネットと各種孔径のフィルターを用いたサイズ分画や、ピンセット、ピペット等による生物の分取に頼らざるを得ず、極めて煩雑で時間がかかり、分取できるものにも制約が大きいのが現状である。

そこで、本試験研究B（現、基盤研究B）では、自然界の不均一で微細な構造をもつ部位・粒子、たとえば水中の懸濁粒子や土壌粒子など、において機能している様々な生物の活性や、その化学組成を測定するシステムの開発を目的とした。

三年間の研究期間において、LASMMA (Laser Semi-Microprobe Mass Analysis)と名付けた、試料セル・YAG レーザー・顕微鏡・質量分析からなるシステムが構築でき、数は少ないが、野外でのトレーサー実験に適用し、その成果を第１２回日本微生物生態学会において発表することができた。本研究の結果、LASMMA システムは、開発の段階を終え、トレーサー実験への応用の段階に入ったことが確認され、さらに、天然同位体比測定への応用にも第１歩を踏み出したものと考えられる。

なお、本報告書では、システムの開発に関する検討と、実際の試料への適用例に関してまとめるとともに、LASMMA システムの取扱説明書として、今後活用できるようにまとめた。

本研究では、レーザー、光学系に関する専門的知識が必要であった。この点に関し、日本高周波（株）技術部の方々、オリンパスエンジニアリング開発課、特に、篠原大三氏のご協力なくして、本研究は遂行できなかったであろう。ここに記して感謝の意を表します。

平成９年３月

研究代表者　　吉岡崇仁

研究実績の概要

## 不均一系微小粒子の生物活性測定システムの開発

（文部省科学研究費基盤研究Ｂ、1994-1996）

不均一系に存在する微小粒子（例えば、プランクトン、細菌やその群体）のもつ生物活性を測定する新しいシステムを開発した。これは、YAG レーザー・赤外顕微鏡・試料セル・ガス精製装置・質量分析計からなる LASMMA（Laser Semi-Microprobe Mass Analysis）システムである。システムは、$^{13}C$ を用いた植物プランクトンの光合成トレーサー実験を対象として開発し、微小粒子を識別する顕微鏡、試料セル、微小部位を燃焼させるためのレーザー照射系、そして、発生したガスを精製、定量する分析系からなる。

レーザー光を赤外顕微鏡のレンズを通して試料に照射するためのレンズ・導入系を作製し、ビデオカメラにより、微小部位を確認しながらレーザー照射できるシステムとした。炭素同位体比のわかっているセルロースフィルターを純酸素下で３０～６０分間処理した。生成した数μg の $CO_2$－C を精製し、同位体比既知の $CO_2$ ガスで希釈した後、同位体比質量分析計で測定した。その結果、レーザー法では、やや低い同位体比が得られたものの、トレーサー実験としては十分な精度をもっていることが判明した。

実際のトレーサー実験に LASMMA 法を適用した。諏訪湖の *Microcystis* を対象に、$^{13}C$ 取り込みを測定した。顕微鏡で *Microcystis* のコロニーを確認しながらレーザー処理した。インキュベート開始時に１.０９ atom%であったものが、２４時間後には３.５２ atom%へと上昇した。懸濁態有機物全体を測定する従来の方法で得られた時間変化と非常によく一致しており、LASMMA 法がトレーサー実験に応用できる段階に達したことが示された。常法に比べて標準偏差が大きい、時間がかかるなど改善すべき点が残されているが、トレーサー実験以外の応用も期待できる手法であることが確認された。

なお、今後の活用のため、LASMMA システム取扱説明書としてまとめた。

キーワード

不均一系　トレーサー実験　YAG レーザー　炭素安定同位体　質量分析

Abstract of Research Project

# Assembling a system for measuring biological activity of micro-level particle in heterogeneous system

(Grant-in-Aid for Scientific Research B, MESSC, Japan, 1994-1996)

New system for measuring the biological activity of micro-level particles, for example, planktonic and bacterial cells and their colony, in heterogeneous system was developed. This system, named LASMMA (Laser Semi-Microprobe Mass Analysis), is composed of YAG laser, infra-red microscope, quartz cell, gas purification line, and isotope ratio mass spectrometer (IRMS). This system was specialized for the $^{13}C$-tracer experiment on phytoplanktonic photosynthesis.

Optical system, by which laser beam was applied to the sample through object lens of IR microscope, was prepared. Using TV camera, micro-spot was identified during laser treatment. Cellulose filter, of which isotope ratio was known, was treated with laser for 30 to 60 minutes. After purification and manometric measurement, the $CO_2$ was diluted with standard $CO_2$ gas of which $^{13}C$ content was known. The gas was introduced into IRMS to determine the $^{13}C$ content. Although the value of cellulose by LASMMA was lower than that by standard method, it suggested that its precision was enough for tracer experiment.

LASMMA method was applied in the field experiment. The $^{13}C$ uptake activity of *Microcystis* was estimated in Lake Suwa. Colony of this alga was identified under microscope, and treated by laser. Its $^{13}C$ content increased from 1.09 atom% at the beginning of the experiment to 3.52 atom% after 24 hr incubation. The $^{13}C$ content changed almost as same as that measured for particulate organic carbon (POC) by the usual way. It was confirmed that LASMMA method could be applicable for field tracer experiment. Moreover, it was suggested that LASMMA system might not be limited for tracer experiment, although the standard deviation measured was larger than usual way and the measurement took much time.

For future application, LASMMA System manual was rounded off.

Key words

Heterogeneous system   Tracer experiment   YAG laser   Carbon stabel isotope   Mass spectrometer

研究組織

研究代表者：吉岡　崇仁　（名古屋大学大気水圏科学研究所　助手）

研究分担者：和田英太郎　（京都大学生態学研究センター　教授）

研究分担者：林　秀剛　（信州大学理学部　教授）

研究経費

| | |
|---|---|
| 平成６年度 | ４,３００千円 |
| 平成７年度 | １,１００千円 |
| 平成８年度 | ８００千円 |
| 計 | ６,２００千円 |

研究発表

（１）論文・学会誌等

なし

（２）口頭発表

吉岡崇仁・和田英太郎（1996/11/16）

不均一系微小粒子の生物活性測定システムの開発

日本微生物生態学会第１２回大会、東京水産大学、東京.

# 目次

# 第１章　LASMMA システムの確立

名古屋大学大気水圏科学研究所　吉岡崇仁
京都大学生態学研究センター　和田英太郎

## １．はじめに

本研究で開発を目指す LASMMA（Laser Semi-Microprobe Mass Analysis）システムは、微小粒子を識別する顕微鏡、試料を特定の雰囲気下（真空、又は、種々の気相中）で検鏡するための石英セル、微小部位を燃焼させるためのレーザー照射系、そして、発生したガスやレーザー処理後のインキュベートで出てくるガスを生成、検出、定量する分析系からなる（図１）。

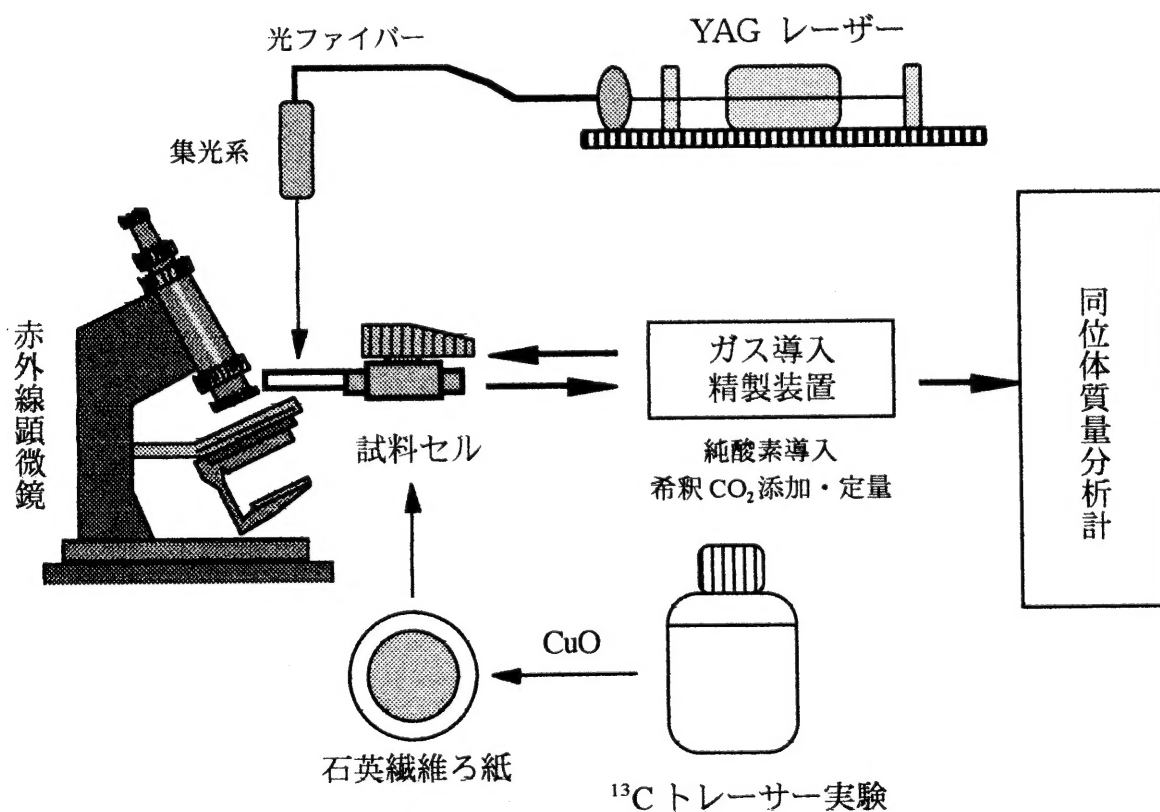



図１　LASMMA システムの基本構成

類似のものとして LAMMA (Laser Micro-prove Mass Analysis) があるが、これは、微小部位の各種元素組成を測定するものである。また、近年、炭酸塩、珪酸塩岩などの炭素、酸素、イオウ同位体比測定が、レーザー微小プローブを用いた手法で行われるようになって

きた（例えば、Sharp 1992; Elsenheimer & Valley 1992; Fallick et al. 1992)。我々は、この手法を生元素として重要な炭素・窒素の循環にまつわる生物活性を測定するシステムに応用することを目的とした。レーザー加工技術は、工学・電子工学の分野で盛んであるが、生態学に応用するのは、おそらく本研究が初めてであろう。

LASMMA システムの最大の特色は、自然条件下での微小環境と生物活動の関係を重視して、微小粒子・生物種・個体を識別しながら、その部位についての生物活性等の情報を入手できる点にある。従来の多くの研究では、土壌やフィルター上に捕捉される懸濁粒子といった混合系全体での測定が多く、種や個体による変動や微小環境との関係については、断片的な解析の段階に留まっている。個(体)生態学的手法としては、オートラジオグラフィーや抗体、DNA を用いたものが開発、応用されているが、煩雑で時間がかかったり、適用できる範囲がそれほど広くないなどの欠点がある。フローサイトメトリー・セルソータによる迅速分取は、その点有望であるが、粒子の識別に限界があり、また、分析のための手法は別に必要である。重炭素（$^{13}$C)、重窒素（$^{15}$N）を用いたトレーサー実験では、適当に同位体を希釈することで、天然同位体比測定の技術を利用し、ミクロレベルでの実験が可能である（Wada et al. 1977; Ichikawa et al. 1992)。しかし、ハンドソーティングや分別ろ過等で分取できない場合には応用範囲が限られてくる。

LASMMA システムでは、生態系・生体内における生元素循環、物質代謝を調べる手法として用いられてきた $^{13}$C、$^{15}$N トレーサー法を個別の種や細胞レベルで検出することが可能となり、微生物の生態・生理学的研究を行ううえで必要な情報量を飛躍的に増大させるであろう。また、 LASMMA システムは、試料の前処理にも活用できる可能性がある。即ち、レーザーにより特定部位を破壊することで生物活性の変化を追跡し、その部位の特性を把握するといった応用が考えられる。

ここでは、$^{13}$C を用いた植物プランクトンの光合成活性測定を目標として、LASMMA システムの確立を行った。

## 2　各構成部分の検討

### 2－1　試料セルの設計

各種ガス雰囲気中に試料をおき、顕微鏡観察可能なセルを作製必要がある。レーザー透過面等には、光透過やガスの吸脱着を考慮し、石英ガラスが適当と考えた。赤外線に対して透明度の高い材質（KBr など）も考慮したが、強度の面で石英が妥当と考えた。セルには、フローセル型と閉鎖型が考えられる。試料として、ガラスないし石英繊維ろ紙に捕集したものを想定しているため、光学的に有効な面積は１ｃｍ×１ｃｍ以上必要と考えられる。Ｏ－リングを用いたフローセル型では、比較的大型にならざるを得ないこと、内部を真空にするにはガラス面の強度が不安であることなどから閉鎖型（つまり、バルブを付けたセル）のものとした。セル部には、光路長２mmの分光光度計用石英ガラスセルを利用し、真空バルブと接続するために，1/2インチ径の石英ガラス管を溶接した。バルブには、スウェジロック社製プラグバルブ（Nupro SS4P4T）を採用し、セルとの接続部にはテフロンフェルール・スウェジロックを用いた（図２）。

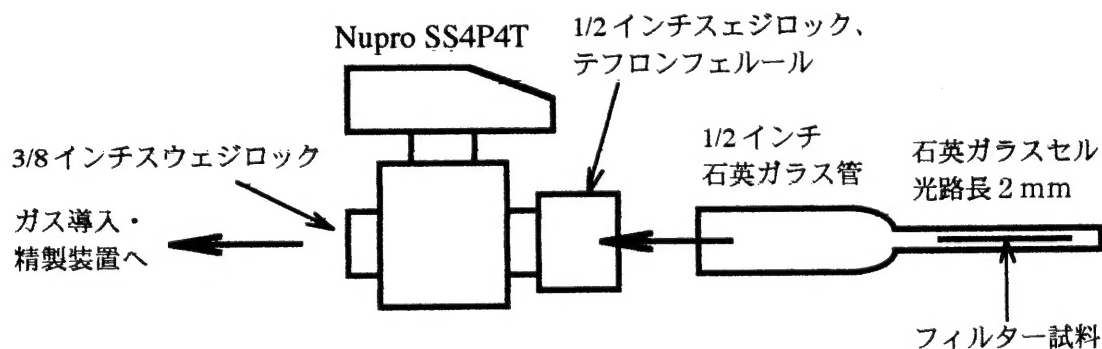



図２　試料セル

２－２　YAG レーザー

試料を燃焼させるレーザーとしては、YAG レーザー（LSO-1Y-07、日本高周波社製）を使用した。これは、波長１０６４nm の赤外線レーザーを連続光マルチモード５Wの出力するものである。ガイド光として、He-Ne レーザー（６３３ nm）を光学台に備えている。シングルモードに比べてパワーは大きいが、光ファイバーによってレーザー光を導入すると、シャープな焦点を結べなくなる。したがって、出力側でシングルモードの光ファイバーを使用し、ファイバーカプラーを新たに作製した。また、顕微鏡導入に際して再結像させるためのアタッチメントを新たに作製した。詳しくは、第４章 II の赤外レーザー照射装置取扱説明書に述べたが、ファイバーカプラーには、オリンパス光学製の光軸調整

冶具（MU-404A）を使用し、アタッチメントは、コリメートユニット、瞳投影レンズ、レーザー光減衰のためのピンホールユニットをもつ直筒からできている。

## 2－3　レーザー顕微鏡

微小粒子識別のための顕微鏡としては、レーザー光導入が可能な赤外顕微鏡（BHSM-IR、オリンパス光学）を採用した。この顕微鏡は、作動距離の長い対物レンズを持つため、検鏡対象としては大型に属する試料セルでも問題がなく使用できる。この赤外顕微鏡は，パルスレーザー搭載の可能なものがあるが，そのレンズ系には，ここで用いるレーザーは出力が高すぎるため，出力のカットや集光のための改良（前述のピンホールユニット）を加えた（実際には、現有の YAG レーザーの性能が低下していたため、ピンホールは使用しなかった）。BHSM-IR は、四眼鏡筒を搭載しており、落射照明装置により、フィルターなどの不透明な試料の観察もできる。カメラ接続の鏡筒にレーザー導入用のアタッチメント直筒をとりつけ、もう一つの鏡筒には、ビデオカメラを取り付けた。しかし、レーザー光が強力なため、テレビカメラがハレーションを起こすため、レーザー照射時の像を確認することができなかった。そこで、熱線反射ミラー（ホットミラー、03MHG007、キノ・メレスグリオ（株））をカメラ取り付け部のレンズ上に設置することでレーザー光がテレビカメラに入らないようにした。これにより、モニターから微小部位を確認しながらレーザー処理することが可能となった。

レーザー顕微鏡の使用、その他については、第４章 II の赤外レーザー照射装置取扱説明書に詳しく述べたので参照されたい。

## 2－4　ガス導入・精製装置

試料をレーザー処理するにあたり、特定の雰囲気にする必要がある。今回の処理では、植物プランクトンの有機態炭素をレーザーで燃焼させて $CO_2$ に変換してその同位体比を測定するのが目的である。天然炭素同位体比測定の場合は、真空条件下で、酸化銅を酸化剤として電気炉で高温処理するが、LASMMA においては、試料部位が高エネルギーに曝されるのが瞬間的であるため、酸化銅のみでは不十分であることが予想される。したがっ

て、雰囲気は純酸素条件がよいと判断した。導入に際して、大気からのコンタミネーションをなくすため、試料セル内をいったん真空にした後、酸素ガスを導入することとした。そのため、ステンレス製の５方バルブ（Whitey SS43ZF2、スウェジロック社）を用い、試料セルはスウェジロックにより共通ポート（５方バルブの下側のポート）に接続するようにした（第４章III.ガス導入・精製装置取扱説明書参照)。酸素には、純度99.995％の純酸素を用い、 $H_2O/CO_2$吸収管、ハイドロカーボントラップ（ＧＬサイエンス社）によってさらに精製した後、試料セルに導入した。酸素導入後、Vent ポートから加圧分の酸素を排出し、１気圧の純酸素雰囲気とするようにした。

レーザー処理により精製したガスには、不完全燃焼によって精製したガス等も含まれていると考えられるため、質量分析にかける前に精製が必要である。前述の５方バルブの一つのポートに、二連の石英製炉心管をつなぎ、手前には白金線（φ０.５ｍｍ×１０ｃｍ）とともに酸化銅（線状）を約１５ｃｍ詰め、次の炉心管には、還元銅（線状）を詰めた。電気炉でそれぞれ６００℃、４００℃に設定した。二つの炉心管の間には、ボールバルブを挿んだ。酸化還元炉からは、微量ながら$CO_2$様のガス（液体窒素温度でトラップされ、エタノール・液体窒素温度、約－９０℃、でガス化する）がコンタミネーションとして発生した。これは、酸化銅を詰め替えたり、炉内を大気圧にしたときなどの後にかなり多く、加熱しながら真空にしておいてもなかなか減少しないものであった。純酸素導入ラインからのコンタミネーションの可能性も考えられ、初期には取り付けていなかったハイドロカーボントラップを設置したり、電気炉による精製を行わずにやってみたり、と、この点に関してかなり時間がかかってしまった。最終的に安定させた後、毎回の試料処理で混入する量は、試料ガスの処理時間約５分間に、約０.０５μgC 程度となった。トレーサー実験では、同位体比的には問題は少ないと考えられるが、希釈率からの$^{13}C$濃度算定には、試料由来の$CO_2$が少ないため注意が必要であった（試料由来の$CO_2$は１μgC 以上であるので、コンタミネーションの量は５％以下であった)。実際の作業では、試料ガス中に０.０５μgC の$CO_2$がコンタミネーションとして付加されており、その同位体比は、便宜上希釈ガスと同じものとして計算した。

導入した酸素を還元炉で除去することはできたが、頻繁に還元銅を再生する必要があっ

たため、実験の多くでは、還元炉を通さずに、または、昇温せず、酸素は真空ラインでの操作で除去した。

還元炉の先はステンレス製のフレキシブルチューブで３方バルブにつなぎ、このバルブは、５方バルブの残りのポートとも接続した。３方バルブの共通ポートは、やはりフレキシブルチューブで、真空ライン（同位体比測定試料用のもの）につないだ。

## ３　燃焼条件

予備的実験から、ガラス繊維ろ紙上に捕集した植物プランクトンは、それ自体ではYAGレーザーの吸収が低く、燃焼に至らないことが判明した。そこで、酸化銅粉末をプランクトンろ過時に加えた。これにより、まず、目的とするプランクトンの近くにある酸化銅にレーザーを照射して熱線を吸収させ、プランクトンの一部を加熱し、焦げた状態にする。その部分は、レーザーをよく吸収するようになるため（つまり、焦げた色で吸収が良くなる)、その後は燃焼が続けられる。直径２５mmのフィルターあたり、１mｇ程度の酸化銅粉末が、吸収もよく、プランクトン判別の妨げともならないことがわかった。１気圧の純酸素雰囲気とした試料セル内の試料でも同様であった。
紙片を鉛筆で黒く塗り、対物レンズ倍率を変えながらLASMMA処理してレーザースポットに直径を測定した。その結果は、５Ｘ＝27.8μm、１０Ｘ＝23.1μm、２０Ｘ＝13.9μm、５０Ｘ＝6.5μmとなり、YAGレーザー本体のレーザービーム径をφ２mmとしたときの理論計算値（表１）に比較的近い値となったが、周辺部も焼けるため、大きめに測定されていると思われる。

表１　試料面でのYAGレーザーのスポット径（計算値）

| 対物レンズ | ピンホール | | |
|---|---|---|---|
| | φ 0.8mm | ナシ(ビーム径φ 2mm) | ナシ(ビーム径φ 4mm) |
| ULWD MIRPlan 5X | 96μm | 38μm | 19μm |
| 10X | 48 | 19 | 9.5 |
| 20X | 24 | 9.5 | 4.7 |
| 50X | 9.6 | 3.8 | 2.4 |

レーザーの照射エネルギーを、試料セル位置で測定（光パワー・メータ、TQ8210、アドバンテスト社製使用）したところ、約５～３５mWであった。対物レンズ倍率×１０で照射時の径を２３μｍとして計算すると、１.２から８.４×１０$^{7}$W·m$^{-2}$となる。Fallick ら（1992）によるレーザーエネルギーと物理効果の関係（表２）でみると、加熱レンジであり、蒸発を生じさせるレンジではなかった。

表２　レーザーエネルギーと物理効果の関係

| エネルギー (W·m$^{-2}$) | 物理効果 |
|---|---|
| ＜１０$^{9}$ | 加熱 |
| １０$^{9}$～１０$^{12}$ | 融解、蒸発 |
| ＞１０$^{12}$ | アブレーション |

（Fallick et al. 1992 より）

しかし、レーザーの直径は、燃焼の痕から推定しており、実際の照射径はこれよりも小さいと思われる。正確にはデータを求めていないが、エネルギーと生成する$CO_2$ガス量とに比例関係が推定されており、また、セルロースやプランクトン試料を処理した結果では、有機物の一部が、レーザー照射により、不完全燃焼、ないし、蒸発しているように思われた（処理後の石英セル内面が白く曇っていることから、このように推測された）。

これは、レーザーのエネルギーが高く昇温が瞬間的に行われ、昇温部分の空間が極めて限られているため、高温で蒸発・燃焼し始めた有機物が酸素と結びつく余裕もなく雰囲気中に拡散してしまうことなどによると考えられる。５.でふれるが、これが天然同位体比レベルでの測定に誤差となって現れている可能性がある。有機物を完全燃焼させるための検討はほとんどできなかったが、今後の課題として大きな問題点である。酸素分圧を上げたり、デッドスペースを小さくたフローセルを用い、酸素気流中でレーザー処理し、セル直後に酸化炉を直結したシステムを採用すれば、$CO_2$収率を上げることができ（処理時間短縮、希釈率による誤差の拡大に関して有利となる）、同位体分別の影響もなくなると考えられる。

## 4　$CO_2$の希釈と試料中$^{13}C$の算出

### 4－1　希釈用$CO_2$ガス

LASMMA処理で得られる$CO_2$ガス量は、微小粒子を識別しながら数十分間処理しても数μgC程度とわずかである。通常のガスクロマトグラフー質量分析計で検出できる量ではあるが、このような識別作業と組み合わせることには非常な困難がある。そこで、本研究では、必要とするガス量は大きくなるが、同位体比測定の精度が格段に高い天然同位体比測定用の質量分析計（MAT252、フィニガンマットインスツルメンツインク社製）を用いた。即ち、量は少ないが$^{13}C$含量の高い試料ガスを、$^{13}C$含量のわかっている$CO_2$ガスで希釈して同位体比質量分析計で測定の後、希釈倍率から、原試料の$^{13}C$含量を求めるというものである。希釈用の$CO_2$ガスは、天然同位体比測定用のワーキングスタンダードとして使用しているボンベガス（－２７.１‰*、１.０８１３ atom%）とグルタミン酸（－１４.０１‰、１.０９５８ atom%）を用いた。希釈用ガスは、二連の真空グリースレスバルブを付けたガラス製リザーバーにいれ、真空ラインにセットする。二つのバルブの間のガラス管部にガスをとり、その部分のみを真空ラインのコールドフィンガーに液体窒素温度で捕集する。リザーバーにとったときの圧力にもよるが、炭素として３０μg程度を目途に採取した。試料由来の$CO_2$ガスが１μgであれば、希釈率（希釈ガス量／試料ガス量）は３０となる。

*‰：天然同位体比を表すときに用いる単位で、次の式で定義される。

$$\delta^{13}C = \left(\frac{R_{sample}}{R_{standard}} - 1\right) \times 1000、$$

ここで、$R = {}^{13}C/{}^{12}C$、標準はサウスカロライナ州のＰＤ層から得られた矢石類の化石（Belemnite、炭酸カルシウム）の炭素である。0.01 atom%がほぼ10‰に相当する。

### 4－2　試料$^{13}C$含量の算出と誤差の検討

本法では、質量分析計で測定できるだけの$CO_2$量とするため試料由来$CO_2$を同位体比既知の$CO_2$ガスで希釈する必要がある。この方法では、いくつかの段階で誤差が考えられるが、操作上の誤差の積み重なりを数値計算で検討した。また、有意な変化とみなすため

に要求される希釈率と試料の $^{13}C$ 含量との関係も検討した。

通常の天然同位体比の測定において、炭素同位体比の分析精度は0.2‰程度である。これは、濃度として0.0002 atom%程度に相当する。しかしながら、希釈操作によって、原試料の同位体比においてみられる誤差はこれより増幅される。希釈用の $CO_2$ の同位体比を-25‰としたときに、希釈率によって試料の同位体比の推定値がどの程度の誤差になるかを検討した。

表3からわかるように、試料の同位体比が高いほど測定の誤差の影響は小さくなる。例えば、試料の同位体比が500‰（1.6576 atom%）であるとき、希釈率30で測定した値から推定される同位体比は、±2.5%のレンジに収まる。

次に、希釈率と試料の同位体比の関係を求め、推定値における誤差がある水準に収まるための範囲を調べた。表4から、試料の同位体比が約500‰の場合、希釈率60までは、5%程度の精度で同位体比が推定できることがわかる。atom%で言えば、1.658 atom%に対して±0.083 atom%である。

一方、$CO_2$ の定量の精度も同位体比の推定値に影響する。ここで用いた $CO_2$ 定量法の誤差は、圧力センサーの読みとり誤差等であるが、炭素量で1.3μg のときで2%程度と考えられる。この誤差は、同位体比の測定値での誤差約3%に相当する。

表3　試料の同位体比の推定値とその誤差の検討

希釈用 $CO_2$ の同位体比を－25‰、希釈率30、同位体比測定の誤差0.2‰としたとき、－25から＋1000‰の値をもつ試料の推定値がどれくらいのレンジになるかを計算した。

希釈率
30

| 試料の同位体比（‰） | -25 | 10 | 50 | 100 | 500 | 1000 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 測定されるべき値 | -25.00 | -23.87 | -22.58 | -20.97 | -8.06 | 8.06 |
| minimum (−0.2) | -25.20 | -24.07 | -22.78 | -21.17 | -8.26 | 7.86 |
| maximum (+0.2) | -24.80 | -23.67 | -22.38 | -20.77 | -7.86 | 8.26 |
| 試料の推定値 min. | -31.20 | 3.80 | 43.80 | 93.80 | 493.80 | 993.80 |
| 試料の推定値 max. | -18.80 | 16.20 | 56.20 | 106.20 | 506.20 | 1006.20 |
| 試料の推定値 av. | -25.00 | 10.00 | 50.00 | 100.00 | 500.00 | 1000.00 |
| 誤差=(max−min)/av×100（%） | 49.60 | 124.00 | 24.80 | 12.40 | 2.48 | 1.24 |

表４　試料の $^{13}C$ 含量の推定値における誤差水準と各希釈率において要求される試料の同位体比
（同位体比の測定誤差を０.２‰とする）

| 希釈率 | 誤差 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 10% | 5% | 2% | 1% |
| 10 | 50 | 80 | 200 | 400 |
| 20 | 80 | 160 | 400 | 750 |
| 30 | 120 | 240 | 600 | 1200 |
| 50 | 200 | 400 | 1000 | 2000 |
| 60 | 240 | 480 | 1200 | 2400 |
| 80 | 320 | 640 | 1600 | 3000 |
| 100 | 400 | 800 | 2000 | 4000 |
| 200 | 800 | 1600 | 4000 | 8000 |
| 300 | 1200 | 2400 | 6000 | 12000 |
| 500 | 2000 | 4000 | 10000 | 20000 |
| 1000 | 4000 | 8000 | 20000 | 40000 |

*$\delta^{13}C$ 値

## ５　標準試料による予備実験

天然レベルの同位体比をもつ試料を用いて、一連の LASMMA 処理を行い、試料の同位体比を推定してシステム全体のチェックを行った。試料には、アドバンテック社のセルロースフィルター（常法による同位体比の測定値は、－２４.８３±０.０２‰、１.０８３９±０.００００ atom%）で、赤外レーザー吸収用の酸化銅粉末（あらかじめ８５０℃で２時間処理したもの）を純水に懸濁させた後、このフィルターでろ過した。減圧乾燥後、適当な大きさにフィルターを切断して、石英セルにいれ、ガス導入・精製装置に取り付けた。いったんセル内を真空に引いた後、純酸素を１気圧でいれ、バルブを閉じて装置から取り外し、レーザー顕微鏡でレーザー処理を行った。３０～４５分間の処理後、再びガス導入・精製装置に取り付け、真空ラインと併用しながら生成した $CO_2$ ガスを分離した。約１から２μgC の $CO_2$ が得られ、ここに、希釈用ガスとして、グルタミン酸から調整しリザーバーに入れた $CO_2$ ガス（－１４.０１‰、１.０９５８ atom%、処理日毎にリザーバーから $CO_2$

ガスをガラス管にとって測定したところ、０.２パーミルほどの変動があったため、セルロースの同位体比を求める際には、処理日のグルタミン酸の値を用いた）を３０～１００μg導入し、定量後、φ６mmのガラス管に封入した。これを、同位体比質量分析計の導入部にとりつけ、ブレーカーにてガラス管を割って$CO_2$ガスを分析管に導入し、同位体比を測定した。この測定では、希釈率は１７から９５であった。希釈率が低いときに値の変動が大きかったが、セルロースの同位体比として、－２５.１０±４.０１‰（１.０８３６±０.００４４ atom%、ｎ＝９）の結果を得た（表４）。

表５　セルロースフィルターの$^{13}$C含量測定値の比較

| | natural | LASMMA |
|---|---|---|
| atom % | 1.0839 ± 0.0000 | 1.0836 ± 0.0044 |
| $\delta^{13}$C (‰) | -24.83 ± 0.02 | -25.10 ±4.01 |
| n | 6 | 9 |

変動は大きいものの、天然同位体比の測定値と良い一致を示した。

## ６　結論

今回開発したLASMMAシステムを用いて、天然レベルの炭素同位体比をもつセルロースフィルターを処理し、その同位体比を測定したところ、変動は大きいものの、平均値としては、ほとんど同じ値が得られた。値の変動には、希釈の影響や、微量のコンタミネーションが影響していると思われるが、通常のトレーサー実験で用いられているatom%単位で０.００４ atom%の差にすぎず、トレーサー実験としては問題ないレベルであると考えられる。また、希釈による誤差の拡大についての数値的検討でも、１.６６ atom%の試料について、希釈率６０程度までは、５％の精度でその同位体比が推定できることがわかった。実際の同位体比測定では、$^{13}$C 含量が高くなると誤差が大きくなる傾向があり、複数の測定で最大１０％程度の誤差があったが、概ね５％以内であった。これは、従来のトレーサー実験と同程度の精度であり、LASMMA 法は、種あるいは細胞レベルでのトレーサー実験への応用が十分可能であると考えられる。

また、セルロースを測定した今回の結果は、表３や４から予想される誤差から比べると、非常に良好な結果であるといえる。変動が４‰と大きいため、すぐに天然レベルに応用することは難しいが、コンタミネーションの低減や、レーザーによる試料の不完全燃焼・蒸発の問題などをクリアーし、希釈率を大きくしないように多くのガスを生成させる工夫などすれば、天然同位体比レベルの測定にも応用できる可能性が示唆される。今回検討できなかったフローセル方式や、GC/C/IRMS との組み合わせなども有望な手段と考えられる。天然同位体比の測定は、物質循環系の駆動様式を理解する上で非常に有効な手法として多くの研究に利用されているが、ミクロなレベルの生物関連試料にも応用の道が開かれることが期待できる。これは、生態学的に分野に限らず、医学生理学の分野にも LASMMA 法の応用分野が広がる可能性を示唆するものとして注目したい。

文献


Elsenheimer, D., and Valley, J. W. (1992) In situ oxygen isotope analysis of feldspar and quartz by Nd:Yag laser microprobe. *Chemical Geology (Isotope Geoscience Section)*, **101**, 21-42.

Fallick, A. E., McConville, P., Boyce, A. J., Burgess, R., and Kelley, S. P. (1992) Laser microprobe stable isotope measurements on geological materials: Some experimental considerations (with special reference to $\delta^{34}S$ in sulphides). *Chemical Geology (Isotope Geoscience Section)*, **101**, 53-61.

Ichikawa, T., Yoshioka, T., Wada, E., and Hayashi, H. (1992) Estimation of nitrogen uptake rate of small zooplankton using $^{15}N$ tracer. *Jpn. J. Limnol.*, **53**, 273-280.

Sharp, Z. D. (1992) In situ laser microprobe techniques for stable isotope analysis. *Chemical Geology (Isotope Geoscience Section)*, **101**, 3-19.

Wada, E., Tsuji, T., Saino, T., and Hattori, A. (1977) A simple procedure for mass spectrometric microanalysis of $^{15}N$ in particulate organic matter with special reference to $^{15}N$ tracer experiments. *Analytical Biochemistry*, **80**, 312-318.

# 第２章　野外トレーサー実験への応用

名古屋大学大気水圏科学研究所　吉岡崇仁、李在鎔
信州大学理学部　林秀剛
京都大学生態学研究センター　和田英太郎

## １．はじめに

植物プランクトンの光合成活性は、従来、$^{14}C$ ないし $^{13}C$ の取り込みによって解析されてきた。ラジオアイソトープの野外使用が厳しく制限される中で、安定同位体である $^{13}C$ による光合成活性測定が広く行われるようになってきた。これらの場合、ガラスフィルターないしはメンブレンフィルターに捕集した懸濁粒子に含まれる $^{14}C$、$^{13}C$ の量から活性を求めるのが一般的である。単位体積あたり、あるいは単位炭素量あたりの活性を評価する上ではこの方法でよいが、植物プランクトンの生理学的意味での活性という点では、懸濁粒子に非生物や不活性な粒子が含まれているため、過小評価となる可能性がある。また、野外の試料には様々な植物プランクトンの種が共存しているが、種毎の活性に違いがあるのかどうかは、この方法では全く予測できない。$^{14}C$ を用いたオートラジオグラフィーは、種や細胞毎の活性を評価できる点で画期的である。しかし、細胞あたりの炭素量の推定を別に行わなければ、比活性を求めることはできない。

LASMMA 法では、$^{13}C$ を取り込んだそれぞれの細胞や種毎に焼いて $CO_2$ の形にするため、その量と同位体比を測定することで、比活性を算定することができるはずである。第１章で、トレーサー実験に十分応用できることが示された LASMMA 法を野外のトレーサー実験に適用して、実際にその有効性を評価した。

なお、この実験は、信州大学理学部附属諏訪臨湖実験所で行ったものである。信州大学理学部の臨湖実習に合わせて調査船、測定機器等を使わせていただいた。臨湖実験所の沖野外輝夫所長はじめ、皆さんにたいへんお世話になりました。また、Tracer MAT による測定に関しては、名古屋大学大気水圏科学研究所の濱健夫博士、京都大学大学院農学研究科の廣部宗氏にお世話になりました。ここに記して感謝します。

## ２．　現場観測・試料採取

トレーサー実験は、長野県にある富栄養湖の諏訪湖表面水を用いて行った（１９９５年８月９日）。船上にて、水温（サーミスター温度計 ET-5、東邦電探）、水中照度（照度計、LI-189、LI-COR Co. Ltd.）、pH（pH メータ HPH-110、電気科学計測）を測定した。結果を表１に示した。

表１　現場観測結果

| 深度 (m) | 水温 (°C) | 照度 ($\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) | pH |
|---|---|---|---|
| 0.0 | 26.58 | 648 | 9.76 |
| 0.5 | | 624 | |
| 1.0 | 26.60 | 76.2 | 9.76 |
| 1.5 | | 28.1 | |
| 2.0 | 26.50 | 12.65 | |
| 2.5 | | 5.91 | |
| 3.0 | 24.38 | 3.79 | 9.37 |
| 3.5 | | 2.28 | |
| 4.0 | 20.65 | 1.43 | |
| 4.5 | | 0.97 | |
| 5.0 | 17.90 | 0.67 | 7.21 |
| 5.5 | 17.75 | 0.53 | |

トレーサー実験用表面水は、１００ℓのポリタンクに採取し、また、溶存無機態炭素（DIC）用試料は、ガラスすりあわせ栓付のビンに取り、ホルマリン固定して実験室に持ち帰った。また、DIC の炭素同位体比測定のために、２００ ml のナシ型フラスコに試水を取り、アンモニアアルカリ性の塩化ストロンチウム溶液を約２ ml 加えて炭酸ストロンチウムの沈澱を作った（水谷・山本 1993）。約半日後、フラスコの底に沈んだ沈澱を注射器で採取し、これを真空採血管（５ ml, テルモ）に移し、その後の分析まで凍結保存した。

試水は、インキュベート前の炭素同位体比測定用として、グラスファイバーフィルター（Whatman GF/F、φ４７ mm）に４００ないし５００ ml ろ過した。これは、定法による天然炭素同位体比測定に供するものである。また、グラスファイバーないし石英ファイバー製のろ紙（φ２５ mm）を用い、試水２５ ml に対し、蒸留水に懸濁した酸化銅粉末（あ

らかじめ、８５０℃２時間処理したもの）をフィルターあたり１mgになるように添加してろ過を行った。これは、LASMMAを用いた測定に供した。酸化銅を加えない試料も調整したが、これは、Tracer MATによる測定に用いた。

インキュベート用には、試水５００mlずつを、１２本のポリカーボネートボトルに分注し、そのうち８本に、$H^{13}CO_3^-$溶液を５ml添加した。この溶液は、$^{13}C$ ９９％$NaHCO_3$の４.１６mM溶液である。

実験は、８月９日の午前１０時３５分に開始した。２７℃、１８０μE・$m^2$・$s^{-1}$、Ｌ：Ｄ＝１４：１０の明暗サイクルの恒温槽でインキュベートした。光強度は、諏訪湖の照度（表１）の減衰率から計算すると、水深約６０cmでの強度に相当する。４、８、１２、２４、２８時間後にトレーサーを添加したボトルの中から２本づつ取り出し、グラスファイバーないし石英ファイバー製のろ紙（φ２５mm）で２５mlづつろ過をした。別に孔径０.２μmのヌクレポアフィルターでろ過した湖水（トレーサーを含まないもの）約２５mlでフィルターを洗浄した後、酸化銅懸濁液を加えてろ過した。８、２８時間後には、トレーサーを添加していないボトルから、天然同位体比法用に４００ml（酸化銅無添加）、LASMMAおよびTracer MAT用に２５mlづつ（酸化銅添加）ろ過した。

フィルターは、６０℃乾燥させたが、分析の前に、$H^{13}CO_3^-$を完全に除去するため、一度純水でしめらせた後、濃塩酸のフュームにさらした後、五酸化リン・NaOHの入った真空デシケータ内で乾燥させた。

POCの天然炭素同位体比は、真空封管燃焼法（Minagawa et al. 1984）により試料を$CO_2$化した後、気体同位体比質量分析計（MAT ２５２、フィニガンマット）で測定した。DICは、真空採血管に保存した$SrCO_3$を１０％リン酸溶液で$CO_2$ガスとし、真空ラインで分離精製し、やはり気体同位体比質量分析計にて測定した。

DIC濃度は、ホルマリン固定した試水を酸性下で純窒素ガスで追い出し、非分散型の赤外分光計に導入し、標準試料によるキャリブレーションから濃度を求めた。試料採取時の濃度３.８０mgC・$l^{-1}$に比べ、実験開始時はやや高くなっていた（４.３２mgC・$l^{-1}$）。DICの天然炭素同位体比の測定値（－１２.７４‰、１.０９７atom%）から、実験開始時のDICの$^{13}C$含量は、１０２６６‰、１１.２３８atom%と計算された。

トレーサー実験用に開発された質量分析計（Tracer MAT、フィニガンマット）による測定は、フィルター試料をスズ箔製のカップに入れて小さく丸めた後、オートサンプラーにセットした。同位体用の作業標準として使用しているアラニンを標準として用いて測定した。

## ３．結果

### ３－１　天然炭素同位体比の時間変化

インキュベート開始後、０、８、２８時間後にトレーサー無添加の試料について炭素同位体比を測定した（表２）。インキュベート８時間後までは、明条件であり、その後１９時間後迄がおよそ暗条件に相当する。

表２　POC の天然炭素同位体比の変化

| time (hr) | $\delta^{13}C$ | sd | atom % | sd |
|---|---|---|---|---|
| 0 | -18.53 | 0.20 | 1.0909 | 0.0002 |
| 8 | -18.82 | 0.32 | 1.0905 | 0.0002 |
| 28 | -17.75 | 0.04 | 1.0917 | 0.0000 |

POC の炭素同位体比は、δ 値で見る限り２８時間後に１パーミルほど高くなっていたが、atom%では、ほとんど変化がなかったと考えて良い。

### ３－２　Tracer MAT による POC の同位体比の変化

$H^{13}CO_3$ 添加したボトルでの POC の同位体比変化を Tracer MAT によって測定すると、８時間後までほぼ直線的に増加し、４時間後で２.４ atom%、８時間後では３.４ atom%に達した（表３）。その後約１９時間後までは暗期であるため、１２時間後では３.５ atom%とほぼ横ばいであった。翌日の明期に入った後は、２４時間後に４.１ atom%、２８時間後に４.５ atom%と最初に比べると増加の割合は小さくなった。

表３　Tracer MAT で測定した POC の同位体比の変化

| time (hr) | $\delta^{13}C$ | sd | atom % | sd |
|---|---|---|---|---|
| 0 | -21.51 | 2.09 | 1.0876 | 0.0023 |
| 4 | 1190 | 54.4 | 2.4056 | 0.0582 |
| 8 | 2180 | 177 | 3.4449 | 0.1852 |
| 12 | 2220 | 22.6 | 3.4931 | 0.0236 |
| 24 | 2810 | 64.9 | 4.1005 | 0.0671 |
| 28 | 3200 | 64.6 | 4.5022 | 0.0663 |
| 28 natural | -15.38 | | 1.0943 | |

２８時間後のトレーサー無添加の POC の値は、天然同位体比測定の結果（表２）とほとんど変わりがなかった。

### ３－３　LASMMA 法による *Microcystis* のコロニーの同位体比の変化

LASMMA 法では、Tracre MAT やその他のトレーサー実験と異なり、特定の粒子のみの同位体比が測定できる。ここでは、最も優占して存在していたラン藻類の *Microcystis* を対象としてレーザー処理を行い、この藻類の同位体比の時間変化を追跡した。

表４　LASMMA 法によって求めた *Microcystis* コロニーの同位体比の変化

| time (hr) | $\delta^{13}C$ | sd | atom % | sd |
|---|---|---|---|---|
| 0 | -15.73 | 4.88 | 1.094 | 0.005 |
| 4 | 938 | 103 | 2.132 | 0.111 |
| 8 | 1970 | 20.9 | 3.225 | 0.022 |
| 12 | 1770 | 136 | 3.021 | 0.144 |
| 24 | 2420 | 167 | 3.696 | 0.174 |
| 28 | 2950 | 69.5 | 4.252 | 0.072 |
| 28 natural | -1.49 | | 1.110 | |

表４の結果からわかるように、Tracer MAT 法と同様、８時間まではほぼ直線的に $^{13}C$ 含量は増大した。１２時間目では、わずか０.２ atom%ではあるが、Tracer MAT 法ではみら

れなかった $^{13}C$ の低下が見られた。その後の増大は、Tracer MAT より大きかった。このように、やや違いはあるものの、LASMMA 法による *Microcystis* の $^{13}C$ 取り込みの時間変化は、POC でみた Tracer MAT 法とほぼ同じであることがわかった。２８時間後の天然同位体比は、０時間に比べて０.０２ atom%とわずかに高かったが、δ 値でみると－１.４９パーミルと非常に高かった。

## ４　考察

### ４－１　LASMMA と Tracer MAT の比較

（特定の植物プランクトンの活性と POC 全体での活性の比較）

天然炭素同位体比、Tracer MAT、LASMMA の３方法による測定結果を図１に示した。Tracer MAT のデータから求めた POC 量の変化も同時に示した。

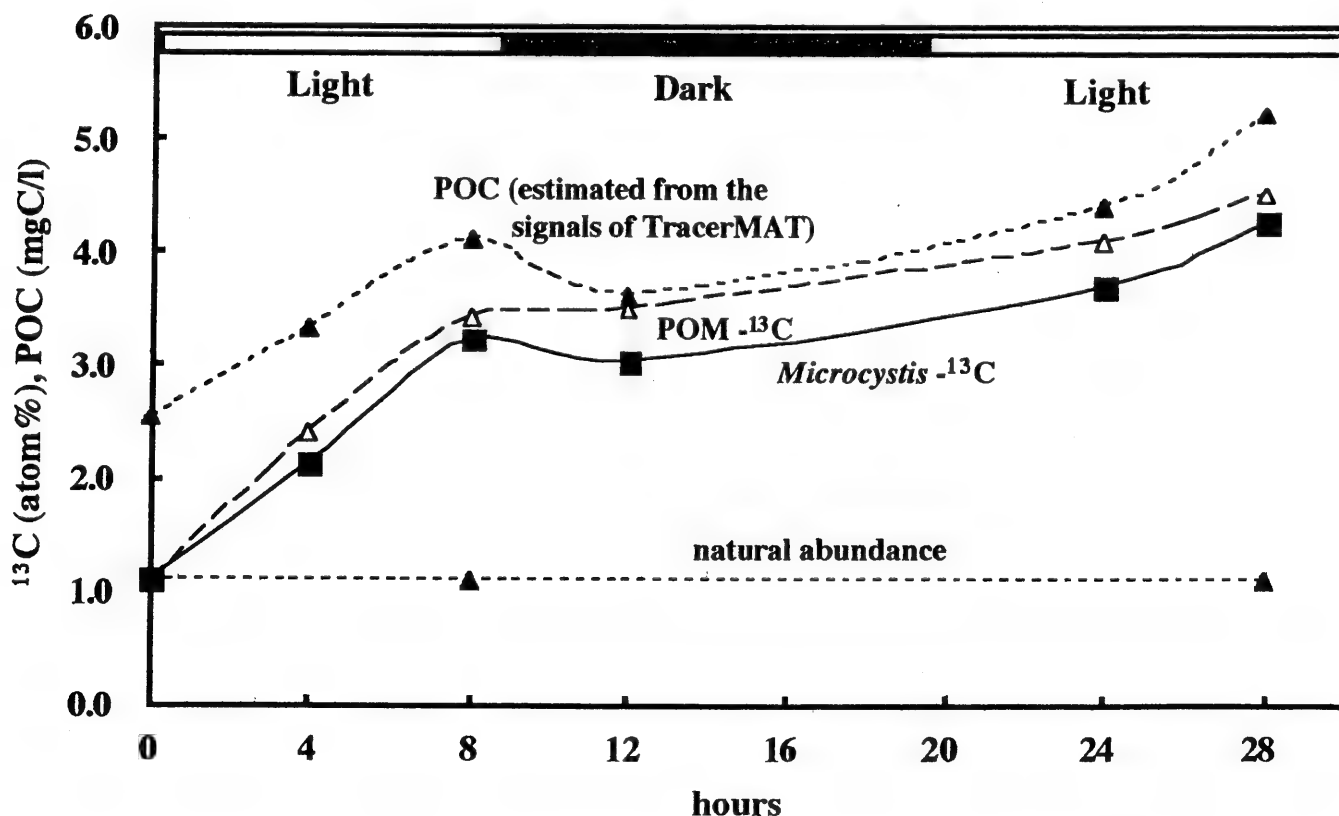



図３　インキュベート実験における POC および *Microcystis* colony の $^{13}C$ 含量の変化

LASMMA法では、常にTracer MAT法より値が低い傾向がみられた。POCには、光合成活性、即ち、$^{13}CO_2$取り込み活性のない有機物粒子が混在していると考えられるので、むしろTracer MATの法が低いと予想されたが、結果はその逆であった。これには、LASMMA法による$^{13}C$の測定が常に低くなる可能性、例えば、有機物の不完全燃焼・蒸発や、希釈の効果などが考えられる。値そのものは低いものの、POCレベルでのトレーサー実験とほとんど同じ時間変化を再現できたことは、LASMMA法がトレーサー実験への実用化段階に達した手法であることが確認できたものといえよう。これは、POC量の時間変化と良い相関を示したことでも支持されるのではないだろうか。この二つの方法での違いは、あるいは、*Microcystis*よりも活性の高い植物プランクトンが共存していたのかもしれない。今回の試料には、渦鞭毛藻の*Ceratium*が比較的多くみられ、また、珪藻の細胞もみられた。LASMMA法では、これらの植物プランクトンの処理を行わなかったため、評価できなかったが、autoecologicalに興味深い点であり、今後の課題となろう。本研究での様々な検討の結果からみて、$^{13}C$含量の違う粒子が共存している場合、LASMMA法を用いれば、その違いを十分検出できるものと考えられる。

表5は、今回得られたデータをもとに、光合成活性の単位として数値を求めたものである。計算は、大槻（1985）にしたがって行った。LASMMA法では、方法上、回転時間と比活性（単位炭素当たりの取り込み活性）でしか表現できない。$^{13}C$含量の結果から想像されるとおり、Tracer MAT法より活性は低いが、時間的変化は同じであった。

文献

Minagawa M., Winter D. A., and Kaplan I. R. (1984) Comparison of Kjeldahl and combustion methods for measuremnet of nitrogen isotope ratios in organic matter. *Analytical Chemistry*, **56**, 1859-1861.

水谷義彦・山本晃一 (1993) 富山県砺波平野浅層地下水中の溶存炭酸の起源、*地下水学会誌*、**35**、77-86.

大槻　晃 (1985) $^{13}C$、$^{15}N$トレーサーの同時使用による霞ヶ浦における炭素・窒素動態の研究、In 日本微生物生態学会編 *微生物の生態13 化学的手法をめぐって*、p.109-124、学会出版センター.

表５　異なる手法による光合成活性の推定値比較

| | POC | | direct estimation from POC | | | Tracer MAT | | | LASMMA | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | obs. | est.* | DC/t | turnover | SPR# | DC/t | turnover | SPR# | turnover | SPR# |
| hr | mgC $l^{-1}$ | | mgC $hr^{-1}$ | hr | $hr^{-1}$ | mgC $hr^{-1}$ | hr | $hr^{-1}$ | hr | $hr^{-1}$ |
| 0 | 2.57 | 2.53 | | | | | | | | |
| 4 | | 3.33 | 0.20 | 17 | 0.060 | 0.11 | 31 | 0.032 | 39 | 0.026 |
| 8 | 4.02 | 4.12 | 0.20 | 21 | 0.048 | 0.12 | 34 | 0.029 | 38 | 0.026 |
| 12 | | 3.61 | 0.09 | 40 | 0.025 | 0.07 | 51 | 0.020 | 63 | 0.016 |
| 24 | | 4.40 | 0.08 | 57 | 0.018 | 0.05 | 81 | 0.012 | 94 | 0.011 |
| 28 | 5.24 | 5.22 | 0.10 | 54 | 0.018 | 0.06 | 83 | 0.012 | 90 | 0.011 |

*: Particulate organic carbon contents were estimated from the signals of Tracer MAT.

#: Specific production rate.

# 第３章　LASMMA システム実用化の見通しと期待される効果

名古屋大学大気水圏科学研究所　吉岡崇仁

最後に、本研究で開発した不均一系微小粒子の生物活性測定システム、LASMMA システムの問題点をまとめるとともに、実用化の見通しと今後に期待される効果に触れて、３年間の研究をしめくくりたい。

## １．粒子に特化した方法

LASMMA 法は、微小粒子の生物活性を測定する手法として開発を計画したが、得られる情報は、粒子毎あるいはその集合体の活性であり、回転速度は求められるが、単位体積、例えば１ℓ当たりの活性は、この方法だけでは推定できないという弱点がある。LASMMA 法では、表５で示したように、回転時間と比活性（単位炭素当たりの取り込み活性）でしか表現できない。体積当たりの速度を求めるには、少なくとも、対象とした粒子密度の推定が別個に必要となる。これは、従来の研究でもなされている種々の方法で可能であるが、LASMMA 法の発展段階としては、同じ範疇に入る粒子の中での変動も検出項目に上がってくることが予想される。この場合、適当な方法がなければ、データのばらつきを与えるのみとなり、物質循環的な考察には不便なものとなろう。しかし、従来の $^{13}$C 法による光合成活性の推定では、活性のない有機態炭素の存在が、回転速度の過小評価になり、生物地球化学的、生態生理学的な情報としては不十分であろう。粒子に特化した方法ということをわきまえれば、応用できる範囲は非常に広いと考えられる。

## ２．処理時間

本研究では、レーザー処理から精製した $CO_2$ ガスの分取までに、４５分から１時間を要している。これは、希釈率を大きくすることによる誤差の拡大を防ぐ目的で、より多くの試料由来の $CO_2$ を得るために時間がかかったものである。植物プランクトンが非常に多い諏訪湖試料でさえこれくらいの処理時間が必要であるとすると、他のより栄養度の低い水界への応用が躊躇される。しかし、ここでの測定では、希釈率は１０前後以下と低くしていたが、希釈率を６０程度にするならば誤差の問題もそれほど大きくないことが数値計算

から示される（第１章、表４）。生成する $CO_2$ 量は、レーザーのパワーやフィルター上での粒子の存在密度、顕微鏡による識別の容易さなどに左右されるため、単純に処理時間に比例するわけではないが、３０分以下にすることはできるものと考えられる。

### ３．応用範囲と今後への期待

LASMMA 法は、より生理学的、生態学的な観点からの研究に威力を発揮するものとなろう。本法の特徴、有効性は、とりもなおさず、不均一な自然界試料において個々の粒子やその集合体（種、個体といった生物自身のこともあれば、土壌団粒や根圏と言った微小環境の場合もある）の生物活性を測定できる点にある。植物プランクトン群集の中で、将来優占してくる種を予測することができれば、迅速な赤潮情報につながる可能性もある。また、個体数が少ないにも関わらず、活性の高い種が見いだされれば、生態系における物質循環に重要な役割を果たしている可能性が示唆され、研究対象の絞り込みも容易になるかもしれない。

このシステムでは、分析部に同位体比質量分析計を用いており、$^{13}$Ｃや $^{15}$Ｎを用いたトレーサー実験をセミミクロな規模（数μg）で可能である。また、今後の検討課題も残されているが、天然安定同位体比の測定にも応用できる可能性が十分にある。この二種類の異なる情報は、物質循環、生態生理学の諸現象の解明にきわめて重要なものである。さらに、システムには、分析部に様々な計器を使用することができる。ガスクロマトグラフィーを用いれば（Laser Semi-Microprobe Gas Chromatography、LASMGC?）、微小部位のガス生成能の解析に、また、レーザーにて切り出した組織片を用いての生理生化学試験にと応用範囲は極めて広い。このことは、ハード（機器）の面だけでなく、ソフト（応用分野、解析手法）の面でも本システムを採用することに大きなメリットを見いだせることを意味し、実用化の可能性は高い。

LASMMA システムは、微小かつ不均一なるがゆえに、直接的探求が難しいとされてきたさまざまな研究分野の発展に大きく貢献するものと期待したい。

# 第４章　LASMMA システム取扱説明書

名古屋大学大気水圏科学研究所　吉岡崇仁

トレーサー実験、さらには天然同位体比測定に向けてのポテンシャルを持つ LASMMA 法を、今後広く活用されるように、取扱説明書としてまとめた。

この LASMMA システム取扱説明書は、以下の３部から構成される。

I.　赤外レーザー（LSO-1Y-07）装置取扱説明書

II.　赤外レーザー照射装置取扱説明書
　赤外レーザー照射装置レーザーパワー測定データ
　ファイバーカプラーの設定方法

III.　ガス導入・精製装置取扱説明書

なお、I は日本高周波（株）による取扱説明書を、また、II は（株）オリンパスエンジニアリングの篠原大三氏によってとりまとめられたものをもとにして作成した。ここに記して感謝の意を表します。

III に関しては、名古屋大学大気水圏科学研究所大気水圏科学研究所環境解析分野所有の真空ラインと、本科学研究費補助金によって作成されたガス導入・精製装置の組合せによる取扱についてまとめたものである。

平成６－８年度文部省科学研究費基盤研究Ｂ(1)
不均一系微小粒子の生物活性測定システムの開発
（研究課題番号　06554036）

# LASMMA システム取扱説明書

平成９年３月

研究代表者　　　吉　岡　崇　仁
（名古屋大学大気水圏科学研究所）

# I. 赤外レーザー（LSO-1Y-07、日本高周波）装置取扱い説明書

## 1. 概要

本レーザー装置は、電源本体及び光学系本体より構成され、水冷、小型、軽量で、波長 1.06μm、出力５Wの赤外レーザー光が得られる。

## 2. 構成

１）電源

入力電圧：AC １００V±５%、単相

出力電圧：DC １００V

出力電力：１２A±３%

２）レーザー発振器

トータルミラー　：１９φ、D=１０mm、反射率１００%

パーシャルミラー：１９φ、D=１０mm、反射率９０%

AR コート

ロッド　：４φ×５０mm

Ｋｒランプ　：４Ｋｒ２、２ atm　（ILC 社製）

レーザー出力　：マルチモード５W（１２A)、波長１０６４ nm

冷却系　：市水、圧力２ｋｇ／ｃｍ²、

流量 15 ℓ／min（5μm フィルター使用）

ガイド光　：He-Ne（波長６３３ nm）

## 3. 動作原理

１）電源系

電源系のブロックダイアグラムを図１に示す。

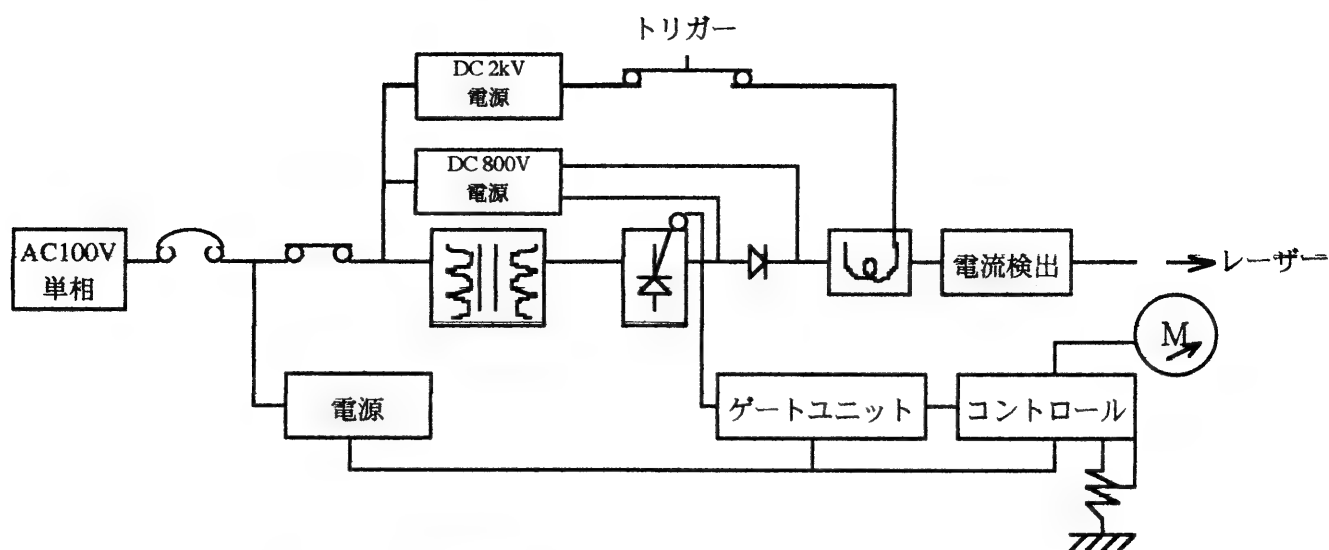



図１． 電源系ブロックダイアグラム

サーキットブレーカーＯＮでは、無負荷状態のため電流は流れず、トランスのオープン電圧となっている。シンマー電源は、８００Ｖ電源によりダイオードでメインの電源に重畳され、出力電圧が８００Ｖに達した後、トリガースイッチをＯＮすると、パルストランスによってメインの電源に２５ｋＶのパルスが重畳されて、ランプが点灯する。と同時に、メイン電源に電流が流れ、電流検出抵抗により検出した電流が、コントロール部の基準電圧と比較され、その出力がゲートユニットに入力され、その後、ＳＣＲをコントロールすることによって電流制御を行う。

２）インターロック系

レーザーヘッドに、水温、水圧の各スイッチが設置されており、パワースイッチのインターロック機構としてリレー制御する。

３）ＹＡＧレーザー発振器系（図２）

レーザー発振器は、両側にトータルミラー１００％反射率とパーシャルミラー９０％反射率、中央にＹＡＧロッドＫｒランプを収納したレーザーヘッド、及び、発振器内に光シャッター、レーザー出力側にＸ－Ｙステージ付光ファイバーカップラーの構成で、光学台に設置され

ている。

ＤＣ入力は、Ｋｒランプにかかり、ＹＡＧロッドを励起（約１００Ｖ、１２Ａ）し、レーザー出力マルチモード５Ｗが得られる。

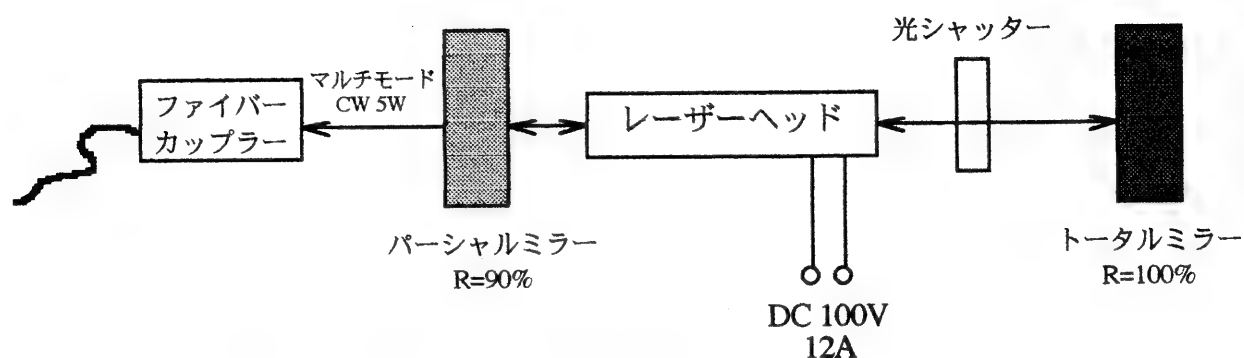



図２．　YAG レーザー発振器ダイアグラム

4.　操作方法

１）レーザー発振器系

①アライメント　　He-Ne レーザーをガイド光に用い、各素子（ミラー、ロッド）のほぼセンターに合わせ、ロッドの両端面の反射をHe-Ne レーザーの発振口に合わせる。トータルミラー（反射率１００％）及びパーシャルミラー（反射率９０％）の反射戻り光をそれぞれ He-Ne レーザー発振口に合わせる。

２）レーザー発振

①電源ケーブルをＡＣ１００Ｖ単相に接続。

②冷却系ホース及びランプ極性を確認し、それぞれ接続する。

③市水を流す（１５ℓ／min）（市水が汚れている場合、Ｋｒランプは放電しない。）

④サーキットブレーカーＣＢをＯＮ　（ＬＩＮＥ）

⑤インターロック系の確認

⑥ CURRENT CONT を２.５０辺りにセットする。

⑦ Powerスイッチを○Nにして、１分間程待つ。

⑧ TRIGスイッチを押す。（Ｋｒランプが放電しないときは、１分間待ってTRIGをかける。それでも駄目な場合は、CURRENT CONTを３から４にあげてみる）

⑨設定電流をCURRENT CONTで設定する。（１２ＡでマルチモードＣＷ出力５Ｗが得られる。）

３）レーザー発振停止

①Powerを○ＦＦにする。

②メインサーキットブレーカーＣＢを○ＦＦにする。

③１～２分待って、市水を止める。

５．保修

１）レーザー発振部

レーザーパワーがでない場合　①ランプ極性の確認

②ランプ寿命時間　１５０時間

③ミラーの方向及び劣化の確認

④ロッド端面の確認

⑤アライメントの不良

２）冷却部

①市水流量の確認（１０～１５ℓ／min）

②市水フィルターの汚れ確認、交換

３）電源部

| | |
|---|---|
| サーキットブレーカーが○Nできない | ○内部ACラインの短絡 |
| Powerを○Nしても動作しない | ○インターロックの確認 |
| トリガーがかからない | ○トリガースイッチ$S_1$の故障 |
| | ○リレーK4の故障 |
| | ○パルストランスの故障 |
| | ○フューズＦ２の焼断（１５Ａ以上にあげるとフューズ(20A)がきれる） |

## II. 赤外レーザー照射装置取扱説明書

1． 概要

本装置は、赤外レーザーを顕微鏡に導入し、試料面に集光するものである。赤外レーザーは波長１０６４ nm の連続発振（ＣＷ）YAG レーザーを使用し、レーザー用ファイバーで顕微鏡に導入する。顕微鏡に導入されたレーザーは、試料面でのスポット径を決めるピンホールを通過し、瞳レンズ・対物レンズにより試料上に集光する。図１に概略を示した。

2． 構成

1）YAG レーザー　　ＬＳＯ－１Ｙ－０７（日本高周波）

2）ファイバー部　　ファイバカプラ　赤外用　Ｚ調節機構付（オリンパス）
　　１０μm シングルモードファイバー
　　コリメートユニット　赤外用

3）顕微鏡部　　赤外顕微鏡（BHSM-IR、オリンパス光学）
　　赤外用四眼鏡筒
　　　直筒（レーザー）／ＴＶカメラ・双眼の三光路
　　　ピンホールユニット（φ 0.8mm）付
　　落射照明装置
　　対物レンズ　ULWD MIRPlan 5X　NA=0.10, WD=20.0
　　　10X　NA=0.25, WD=18.5
　　　20X　NA=0.40, WD= 8.1
　　　50X　NA=0.55, WD= 6.0
　　鏡体・レボルバ・ステージ

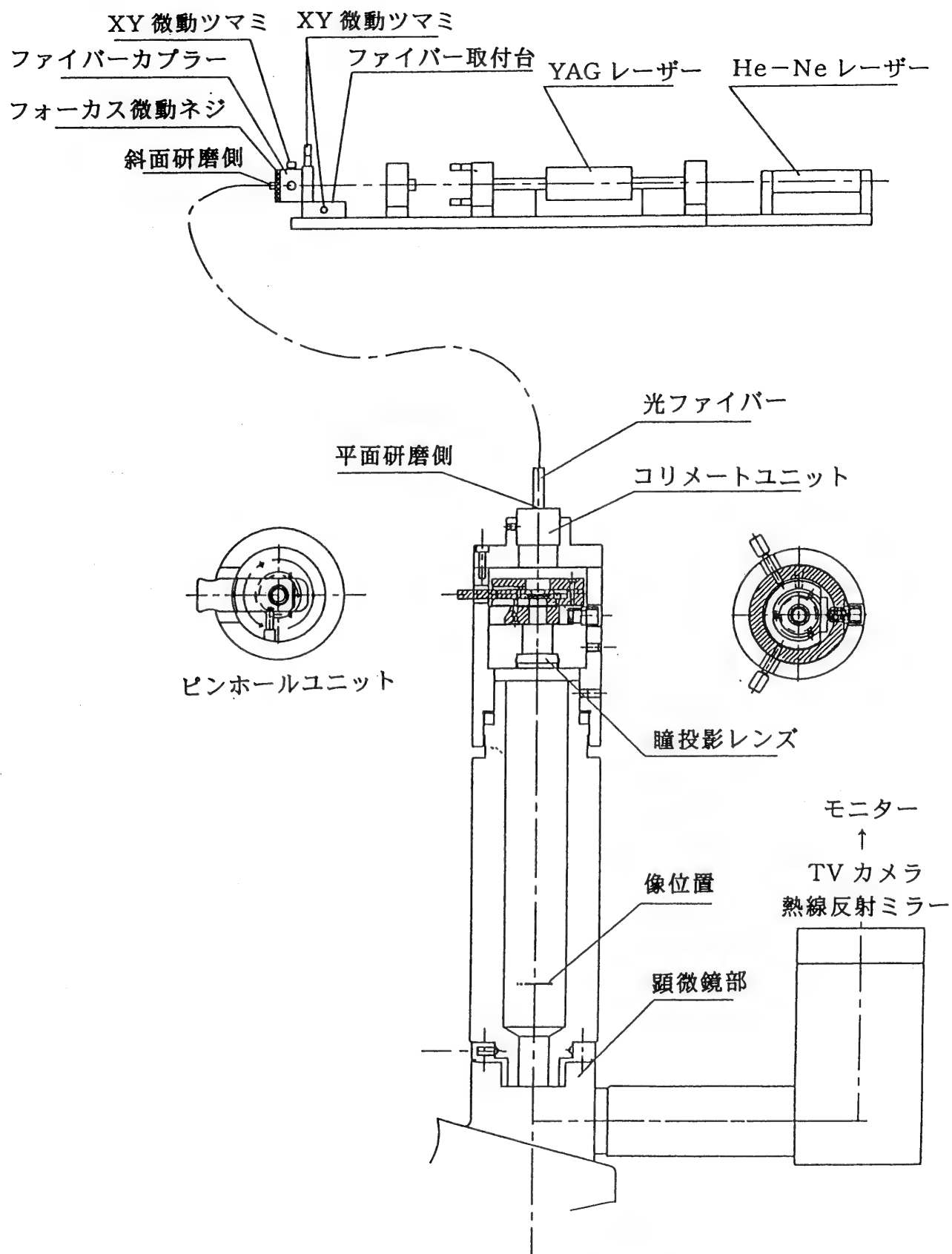



図1． 赤外レーザー照射装置の概略

## ３．調整方法

１）YAG レーザーとファイバーの接続調整

（ファイバーカプラーの設置方法及びファイバーカプラー使用における注意参考のこと）

① YAG レーザーのファイバー取付台にファイバーカプラーを取り付ける。

② ファイバーカプラーにファイバ（斜面研磨側）を取り付ける。

③ ファイバーカプラーのレンズから反射してくる干渉縞がレーザー出射部と同一中心になるように、ファイバー取付台の XY 微動ツマミを動かして調整する。

④ ファイバー出射パワーが最大になるように、ファイバーカプラーの XY 微動ツマミとフォーカス微動ネジを動かして調整する。

・フォーカス微動ネジを少し動かし、次に XY 微動ツマミで最大パワー位置を探す。

・これを数回繰り返し、最適にフォーカス位置を見つける。

・干渉縞がレーザー出射部の中心からずれた場合は、③の調整を行い、上の調整に戻る。

（注意）

・すでに、④の調整はしてあるので、レーザー側の光軸がずれた場合は、③の調整だけでよい。

・また、④の調整をする場合は、微動は少しづつうごかすこと。いったん、光軸が大きく崩れた場合には、メーカー調整が必要である。

・レーザー光量をパワーメーターでモニタする場合は、レーザー励起部の光や外部光の影響を考慮すること。

２）ファイバーとコリメートユニットの接続調整

① コリメートユニットにファイバー（平面研磨側）を取り付ける。

② フォーカス微動ネジの止めネジを緩める。

③　コリメートユニットからの出射光が平行光になるように、フォーカス微動ネジを動かして調整する。即ち、出射ビーム径が近くと遠くとでほぼ同じになるように調整する。

④　フォーカス微動ネジの止めネジを締め付け固定する。

3）直筒部の組立

①　直筒部を顕微鏡四眼鏡筒に取り付け、ビスで固定する。

②　直筒部に、コリメートユニットを取り付け、ビスで固定する。

4．使用方法

1）直筒部ピンホールの位置出し（ピンホールを使用しない場合は不要）

①　四眼鏡筒の切り替えノブをＢＩ側に、照明装置前面の切り替えノブをＢＦ側にする。

②　対物レンズからのレーザー光量が最大になるように、２本のピンホール位置出しツマミで調整する。

2）試料のピント合わせ

①　顕微鏡の電源スイッチを入れる。

②　四眼鏡筒の切り替えノブをＢＩ側に、照明装置前面の切り替えノブをＢＦ側にする。

③　試料をステージに乗せ、ピントあわせと照明光量の調整をする。

④　レーザー照射部分を視野の中央部に移動する。

3）試料へのレーザーの照射

①　四眼鏡筒の切り替えノブをTV側にする。

②　ＴＶカメラがとりついている場合は、ＴＶカメラでピントあわせと位置出しを行う。ＴＶカメラ用の接眼レンズの上に、２４mm角に切断した熱線反射ミラー（ホットミラー、03MHG007、キノ・メレスグリオ（株））を載せる。これにより、レーザー照射時のハレーションを解消できる。

③　YAGレーザーのシャッタを開け、試料にレーザーを照射する。

## ５．YAG レーザー集光ユニット（ＦＣ２０ＹＧ）の使用方法

### １）接続方法

① コリメートユニットからファイバーを取り外す。

② ファイバをYAG集光ユニットを取り付ける。

調整の必要はない。

顕微鏡に接続し直す場合は、上と逆の手順で行う。その場合も調整の必要はない。

### ２）使用方法

レーザーの集光位置は、最終レンズから約３８mmである。スポット径は、約５０μmである（レーザービーム径を約２mmと仮定）

約３８mm離して試料をおき、YAGレーザーのシャッタを開けて照射する。

（参考）

試料面でのYAGレーザーのスポット径（計算値）

| 対物レンズ | ピンホール | | |
|---|---|---|---|
| | φ 0.8mm | ナシ(ビーム径φ 2mm) | ナシ(ビーム径φ 4mm) |
| ULWD MIRPlan 5X | 96μm | 38μm | 19μm |
| 10X | 48 | 19 | 9.5 |
| 20X | 24 | 9.5 | 4.7 |
| 50X | 9.6 | 3.8 | 2.4 |

・レーザー発振器から出るビーム径によりスポット径が異なる。

・スポット径はピンホール径が大きくなるのに反比例して小さくなる。

・試料面でのレーザーパワーは、ピンホール径に比例して大きくなる。

## 赤外レーザー照射装置
## レーザーパワー測定データ

測定日：1995、7、12

測定は、光パワー・メータ（TQ8210、株アドバンテスト）を使用し、He-Ne は 630nm、YAG は 1060nm にて測定した。各レーザーに光軸を合わせた後測定したが、YAG レーザーについては、発振器の調整が不良であったため、後の使用時に比べて、出力は２から３分の１であった。試料処理時は、２５ mW 以上であった。なお、He-Ne と YAG とでは、光軸が少しずれていることが判明した。

（１）He-Ne レーザー（633nm）

| 集光レンズ前 | ファイバー出射後 |
|---|---|
| 0.25 mW | 0.17 mW |

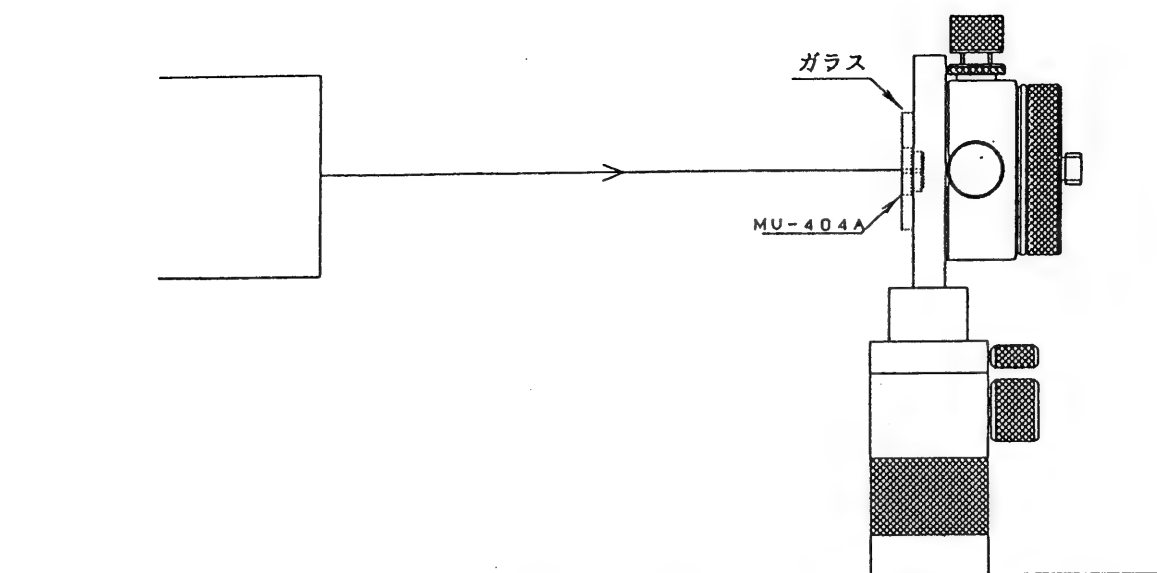
（２）YAG レーザー（1064nm）

| 集光レンズ前 | 集光レンズ後 | ファイバー出射後 | コリメートユニット後 | YAG 集光ユニット*後 |
|---|---|---|---|---|
| 60 mW | 55 mW | 35 mW | 30 mW | 35 mW |

*YAG 集光ユニットは、マルチモードレーザー用のものである。

（３）対物レンズ後の YAG レーザー

| | 明視野キューブ無し | | 明視野キューブあり |
|---|---|---|---|
| 対物レンズ | φ 0.8 ピンホール | ピンホール無し | ピンホール無し |
| ULWD MIRPlan 5X | 3 mW | 13 mW | 10 mW |
| 10X | 2.5 | 12 | — |
| 20X | 2.4 | 12 | — |
| 50X | 2.2 | 10 | — |

## ファイバーカプラーの設定方法

1．しっかりとしたベースまたは、定盤上に光源とファイバーカプラーを設置する。

2．ファイバーカプラーの中心に光軸が入射するように高さを合わせる。
（光軸調整冶具 MU-404A 使用）

3．ファイバーカプラー内のレンズに垂直に光軸が入射するように、平行度の出ているガラス等を上図のように設置し、反射光が光源に戻るように光源またはファイバーカプラー本体を調整する。

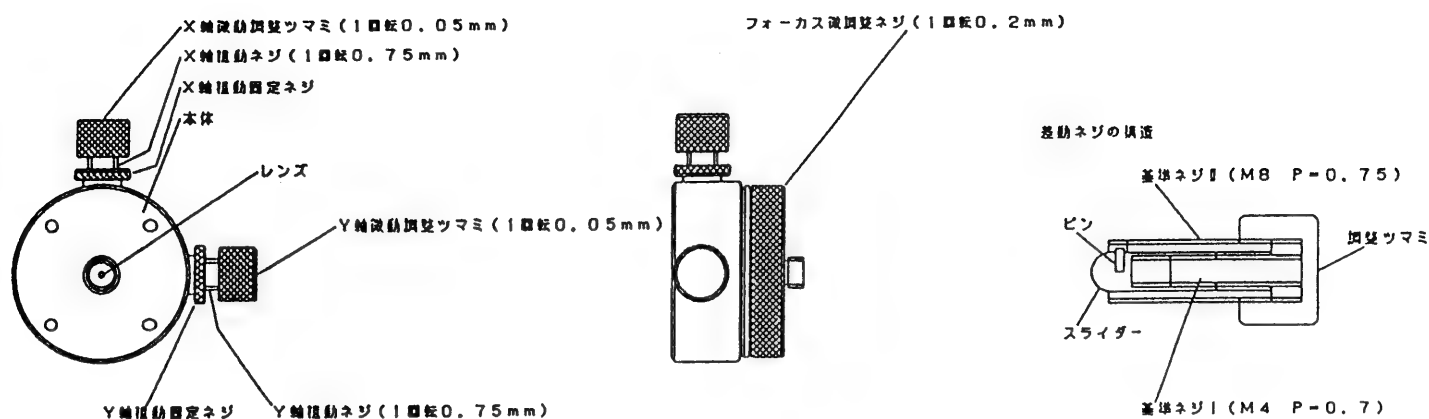
4．ファイバーをレセプタクルに取り付け、差動ネジを回転させて光量が最大値になる位置を決定する。この作業は、シングルモードファイバーで行うと時間がかかる場合があるので、５０μm 程度のマルチモードファイバーで中心出しをした後シングルモードに変えると容易になる。

5．フォーカスネジを少し回転させ、差動ネジで光量が最大値となる位置を探す。

6．５の動作を、最高強度のフォーカス位置にくるまで繰り返す。

（簡単な設定方法）
ファイバーカプラーを光軸内に設置し、レンズから反射してくる干渉縞がレーザー出射部と同一中心になるように、高さとアオリを調整し固定する。その後、４、５の操作を行う。

（注意）
カプラー内のレンズからの戻り光が、レーザーの発振器内に入射するとレーザーの安定性が損なわれる場合がある。この場合、３の調整時に光軸が少し傾いて入射するようにするか、アイソレーターを光源とカプラーの間に挿入すると良い。ただし、傾けて入射した場合、カップリング効率は悪くなる。

## ファイバーカプラー使用における注意

### ○レーザーの光軸がレンズの中心に調整できない場合

X軸・Y軸差動ネジは、あらかじめ基準位置に設定されているが、レーザーの光軸が移動できず、レンズの中心に光軸を持ってくることが困難な場合、粗動固定ネジを緩め、調整つまみ側に密着させて固定し、調整つまみを回転しレンズの光軸に合わせる。この場合、粗動ネジだけが回転するが、調整つまみを固定しないと、粗動・微動両方のネジが回転し、調整し難くなるための措置である。この後、固定ネジを本体側に固定し、微調整する。固定ネジの締め付けが甘い場合、微調整時に粗動ネジも回転してしまうため、本来の性能を発揮できなくなる。

### ○調整つまみが基準ネジIIから外れてしまった場合

差動ネジは、図のようにピッチの違うに種類のネジより構成され、回転によるピッチ差分の移動が行える。この差動ネジは、調整つまみ8回転（0.4 mm）の移動が可能であるが、それ以上回転させると、基準ネジIIと調整ネジが外れてしまう。この場合は、ネジ部を本体からはずし、スライダーについているピンを基準ネジIIの溝の中心位置までいれ、調整つまみを回転し、基準ネジIをスライダーにねじ込み、調整ネジと基準ネジIIがかみ合う位置までねじ込む。両方のネジが入った位置から4回転回した位置で、粗動固定ネジ

を調整ネジに密着させて固定し、調整ネジを回しても回らないように固定する。その後、本体に取り付け、レンズの中心と本体の中心が合う位置で、粗動固定ネジを本体側に密着させしっかりと固定する。

○フォーカス調整ネジの位置がわからなくなった場合

フォーカス調整ネジを回転し、レセプタクルのついている黒いアルミの表面と、フォーカス調整ネジ（SUS）の表面が一致する位置まで回転させる。この位置より、アルミ部が０.５ mm 入った位置がフォーカス位置となるため、フォーカス調整ネジを左に２.５回転回す。これで、ファイバー端面上におおよそ焦点が合う。

<注意１>

ネジは、差動部、フォーカス部ともにバックラッシュ（ネジのガタ）があるため、位置決めは、常に同一方向から行うこと。回しすぎた場合は、一度戻してから再調整すること。特に、フォーカス調整ネジは、回転方向が変わると出力が出なく場合がある。また、高効率を得るためには、レーザー発振器とファイバーカプラーの距離はできるだけ近づけておくこと。

<注意２>

ネジが堅くて回らない場合は、限界点なので無理に回さない。レンズに埃がつくと、効率が悪くなるので、使用しないときは、附属のキャップをレセプタクルに取り付け、反対側はテープ等で封印し、乾燥した場所に保管すること。また、結露を防ぐため、冷えた場所から暖かい場所に移す場合は、ビニール袋等に入れて、室温になってから出すこと。

## III.　ガス導入・精製装置取扱説明書

### 1. 概要

ガス導入・精製装置は、試料セル内を特定の雰囲気とするための真空ラインと、ガスの精製を行う真空ラインとからなる。両者は真空バルブによって連結されており、さらに、ガスを捕集するための真空ラインとは、ステンレス製のフレキシブルチューブでつながれる。精製ラインには、酸化触媒用の白金線（φ０.５ mmX １０ cm）を挿入した酸化銅の電気炉と還元銅の電気炉が含まれている。

### 2. 構成

１）試料セル

φ１２ mm 石英ガラス管に光路長２ mm の石英ガラスセルを熔着したもの

プラグバルブ（Nupro SS4P4T、スウェジロック社）

ガラスとの接続部には、テフロン製のフェルールを使用。

２）試料セル取り付け部

５方バルブ（Whitey SS43ZF2、スウェジロック社）

３）純酸素導入部

高純度酸素ボンベ（99.995％）

$H_2O/CO_2$吸収管、ハイドロカーボントラップ（ＧＬサイエンス社）

φ１／１６インチステンレス管で５方バルブに接続

４）酸化・還元炉

白金線（φ０.５ mmX １０ cm）、酸化銅（線状）を詰めた石英管（φ１０ mm）、６００℃の管用電気炉に挿入する。

還元銅（線状）を詰めた石英管を４００℃の管用電気炉に挿入する（但し、多くの場合、還元炉は昇温せずに通過させるだけとした）。

5方バルブとは、ステンレス製フレキシブルチューブで、石英管同士は2方バルブで、真空ラインとは3方バルブからフレキシブルチューブで接続する。この3方バルブは一方で先の5方バルブと直結する。接続部には、ウルトラトールフィッティングを使用した。

5）真空ライン

炭素・窒素安定同位体比測定試料処理用の真空ラインを使用した。

冷却トラップの他、圧力ゲージを設置した定量部、希釈用ガス導入部、試料ガス捕集部を有する。

接続は、ステンレススウェジロックまたは、ウルトラトールフィッティングによって行った。概略を図1に示す。

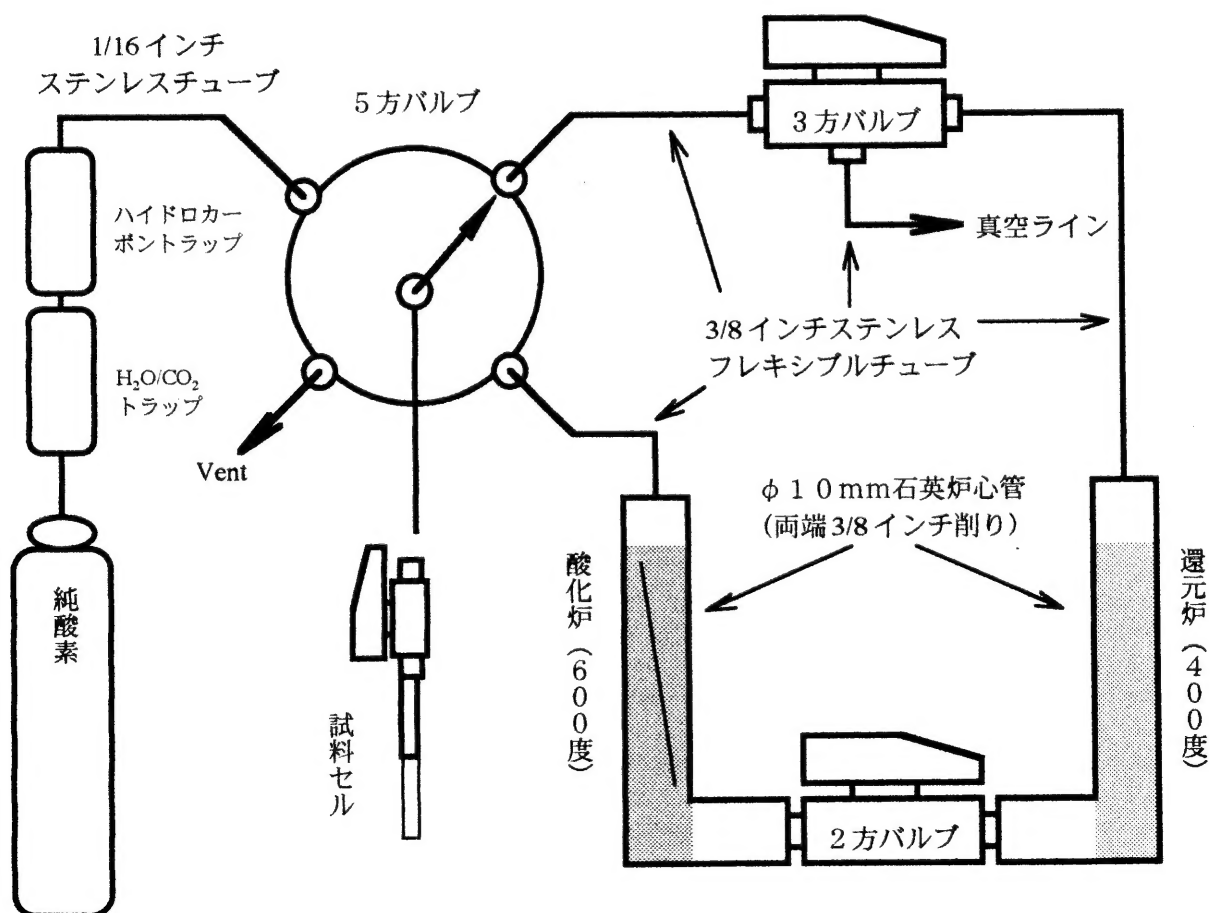



図1　ガス導入・精製装置の概略図

## 3. 使用方法

### 1）試料セル中の雰囲気の交換

本研究では、$^{13}C$ トレーサー実験による植物プランクトンの光合成活性測定を目的としているので、試料セルは、純酸素雰囲気にする必要がある。

まず、試料（石英またはガラス繊維ろ紙に捕集したプランクトン）を適当な大きさにきり、石英セルにいれ、テフロンフェルールを用いたスウェジロックによって2方バルブに接続する。これを、スウエジロック接続によって5方バルブに取り付け、3方バルブを経由して真空ラインによって排気する。このとき、ドライヤーによって試料セルを暖めることで、水分を除去する。1 mmHg 程度まで排気した後、セル上のバルブをいったん閉じ、5方バルブを酸素ボンベ側につなぐ。セル上のバルブをゆっくりと開けた後、5方バルブを Vent（この先は、チューブにつないであり、ガラス容器中の水の中に先端を沈めてある。酸素ガスが逃げていくのが確認できるとともに、大気のセルへの侵入を防ぐ）にして、酸素の圧力を大気圧にまで下げる。バルブを閉めた後、5方バルブは真空ライン側につないでおく。試料セルをその上の2方バルブとともに、ラインから取り外し、レーザー処理を施す。ボンベを空気やヘリウム、アセチレンなどを含んだ気体に交換することで、様々な雰囲気下に試料をおくことができる。

### 2）レーザー処理によって生じた $CO_2$ ガスの分離精製

レーザー処理の終わった試料セルは、再び5方バルブに取り付け、まず真空排気する。酸化炉側にしてさらに真空度が良くなるまで待ったのち、酸化・還元炉の中間にある2方バルブを閉じ、試料セル上のバルブを開く。しばらく待ったのち、3方バルブを閉じ、炉間のバルブを開く。その後、炉間のバルブを閉じ3方バルブを開いてガスを真空ラインの冷却トラップ（液体窒素温度）に導入する。３０秒から１分

後、３方バルブを閉じ、炉間バルブを開く。冷却トラップで捕集されないガス（酸素、窒素ガス）をラインから排気する。冷却トラップを排気ラインから切り放した後、再び炉間バルブを閉じ、３方バルブを開いてガスをトラップに導入する。この操作を数回繰り返して、レーザー処理によって生じた $CO_2$ ガスを分離精製する。全体で約５分程度で終了する。

３）希釈用ガスの導入とサンプルガラス管の作成

冷却トラップに捕集された $CO_2$ は、液体窒素温度で十分排気した後、約-90 度のエタノール液体窒素温度とし、５分間放置して $CO_2$ をガス化させる。これを、圧力ゲージを設置した定量部のガラスフィンガー部に液体窒素温度で移動・捕集する。定量部をバルブ操作で切り放し、フィンガー部を室温にした後、内部の圧力を測定、室温を記録する。これらのデータをもとに、生成した $CO_2$ ガスの定量を行う。一方、同位体比のわかっているボンベ $CO_2$ ガスを別系統から真空ラインに導入し、試料 $CO_2$ の入っているフィンガーに移して試料ガスを希釈する（約１０から６０倍）。全体のガス量を圧力ゲージで測定し希釈率を求める。このガスをφ６ mm のガラス管に液体窒素温度で捕集し、熔封してサンプル管を作成する。これを、同位体比質量分析計の導入部においてブレーカーによって割り、$CO_2$ ガスを導入し同位体比を測定する。